

## IN VITRO ANDROGENEZIS INDUKCIÓJA FŰSZERPAPRIKA (*CAPSICUM ANNUUM* L.) MIKROSPÓRA TENYÉSZETBEN

<sup>1</sup>LANTOS CSABA, <sup>2</sup>GÉMESNÉ JUHÁSZ ANIKÓ, <sup>3</sup>SOMOGYI GYÖRGY, <sup>1</sup>MIHÁLY RÓBERT,  
<sup>3</sup>SOMOGYI NORBERT, <sup>1</sup>PAUK JÁNOS\*

<sup>1</sup>Gabonatermesztési Kutató Közhasznú Társaság, Biotechnológia Osztály,  
6726 Szeged, Alsó kikötő sor 9.

<sup>2</sup>Medimat Kft., 1224, Budapest, XIV utca 37.

<sup>3</sup>Fűszerpaprika Kutató-Fejlesztő KhT, 6728, Szeged, Külterület 7.

\*janos.pauk@gk-szeged.hu

### ABSTRACT – Induction of *in vitro* androgenesis in isolated microspore culture of condiment paprika (*Capsicum annuum* L.)

Isolated microspore culture is an intensively studied technique in condiment paprika cell and tissue culture research. The response of one Hungarian ('Szegedi 178') and two Spanish ('Jeromin' and 'Jaranda') condiment paprika genotypes were tested in isolated microspore culture. The paprika microspores were co-cultured with wheat ovaries ('CY-45') in a modified W14 liquid medium. The effect of the growth regulators in induction medium on microspore-derived embryoid production was determined. The best results were achieved with growth regulator free liquid medium and a combination of two growth regulators (0.5 mg ml<sup>-1</sup> 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 0.5 mg ml<sup>-1</sup> kinetin). Green plantlets were regenerated from microspore-derived embryoids. Some of the regenerants were distorted with leaf rosettes.

**Kulcsszavak:** mikrospóra tenyésztés, paprika (*Capsicum annuum* L.), embriógenézis, doubled haploid növény

**Keywords:** microspore culture, paprika (*Capsicum annuum* L.), embryogenesis, doubled haploid plant

**Rövidítések:** 2,4-D:2,4-diklór-fenoxi-ecetsav, DH:doubled haploid, PAA:fenil-ecetsav

**Abbreviations:** 2,4-D:2,4-dichlorophenoxyacetic acid, DH:Doubled haploid, PAA:Phenylacetic acid

## BEVEZETÉS

A fűszerpaprika termesztés nem csupán több évszázados hagyomány Magyarországon, ahol a piros paprika örlemény tradicionálisan az egyik fő összetevője a magyar ételeknek, de Magyarország az egyike az öt legfontosabb fűszerpaprika termeszítő országnak (SOMOGYI et al. 2003). A huszonegyedik században a mezőgazdasági termékeknek, így természetesen a genetikai háttérnek, a fajtáknak is magas minőséggel, termésmennyiséggel és megbízhatósággal kell rendelkezniük a gazdasági versenyben. Az Európai Unió és a Magyar Szabadalmi Hivatal (MSZH) növényfajtákkal szemben támasztott elvárásait is figyelembe véve (megkülönböztethetőség, egyöntetűség és stabilitás) egyre nagyobb jelentőséget kaphatnak a jövőben a versenyképes fajták előállítását segítő biotechnológiai módszerek. Az *in vitro* haploid előállítási technikák azon módszerek közé tartoznak, amelyek nemcsak külföldön, de Magyarországon is bizonyították már, hogy a fajtaelőállítás szolgálatában állnak (LI et al. 1986, HESZKY and KISS SIMON 1992, PAUK et al. 1995, GÉMES et al. 2006, MITYKÓ and GÉMES 2006).

A portoktenyésztés jól ismert módszernek számít a paprika doubled haploid (DH) vonalak előállításában. A szakirodalom első publikációi 1973-ban számoltak be portoktenyésztés eredetű paprika növények előállításáról (GEORGE and NARAYANASWAMY 1973, KUO et al. 1973, WANG et al. 1973). DUMAS DE VAULX et al. (1981) jelentősen javították a paprika portoktenyésztés módszerét, amelyet több kutatócsoport tanulmányozott és továbbfejlesztett ((MITYKÓ et al. 1995, 1999, DOLCET-SANJUAN et al. 1997, GÉMES et al. 1998, 2006, GYULAI et al. 2000, BÁRÁNY et al. 2005, KIM et al. 2004).

Bár a paprika nemesítők a gyakorlatban is alkalmazzák a portoktenyésztést, néhány tényező (munkaerő igény, genotípus függőség, donor növények felnevelése és kora) még korlátozza a széleskörű felhasználást (KRISTIANSEN and ANDERSEN 1993, MITYKÓ et al. 1995, BUYUKALACA et al. 2004, ERCAN et al. 2006). Az izolált mikrspóra tenyésztés egy alternatív módszert jelenthet a paprika DH növények előállítására. A módszer előnye, hogy a növények nem a portok falából regenerálódnak, hanem az izolált sejtekből, így az embriógenezis folyamata az első sejtosztódástól kezdve nyomonkövethető.

A paprikát haploid szövettenyészetben nehezen reagáló fajnak ismerjük, ami lassítja a haploid előállítási módszerek fejlesztését. A paprika haploidok előállításának szakirodalmában ma is újnak számít az izolált mikrspóra tenyésztés. Habár SUPENA et al. (2006) tettek említést először izolált mikrspóra tenyészet eredetű növények előállításáról, az első részletes mikrspóra tenyésztési publikáció 2008-ban jelent meg (KIM et al. 2008). A szerzők (KIM et al. 2008) a 'Milyang-jare' genotípus izolált mikrspóra tenyészetében optimalizálták a mikrspórák sűrűségét ( $8 \times 10^4 - 10 \times 10^4$ ) és a tápoldat szénhidrát (9% szacharóz) tartalmát.

Jelen tanulmányban, egy magyar és kettő spanyol fűszerpaprika fajta izolált mikrspóra tenyésztéséről számolunk be. Hormonmentes tápoldat, egy hormon – fenil-ecetsav (PAA) – és egy hormonkombináció – 2,4-diklór-fenoxi-ecetsav (2,4-D) és kinetin – mikrspóra eredetű embrioidok számára gyakorolt hatását tanulmányoztuk.

## ANYAG ÉS MÓDSZER

### Növényanyag

Egy magyar ('Szegedi 178') és két spanyol ('Jeromin' és 'Jaranda') fűszerpaprika fajtát használtunk a paprika mikrspóra tenyésztési kísérleteinkben. Az említett genotípusok fontos nemesítési alapanyagok a hazai nemesítési kutatásban.

### Alapanyag előállítás körülményei, donor bimbók begyűjtése

A donor növényeket félautomatizált Hensler üvegházban neveltük fel (automatizált hőmérsékletszabályozás, ventilláció és árnyékolás). A növényeket természetes megvilágítás mellett neveltük. Az üvegházban a paprika növények számára 20-28°C nappali és 15-19°C éjszakai hőmérsékletet biztosítottunk. A donor növények tápanyag utánpótlására Volldünger® (N:P:K:Mg/14:7:21:1, 1 % mikroelem, úgymint B, Cu, Fe, Mn, Zn) műtrágyát használtunk, a műtrágyát kéthetente vízben feloldva adagoltuk a növények igénye szerint.

A paprika bimbók csésze és szíromlevelének aránya, a portokok mérete és színe jó markere a mikrspórák fejlettségi állapotának. A donor bimbók begyűjtésekor a csésze és szíromlevelek aránya 2/3:1/3 volt, a portok több mint fele részben antociános színeződést mutattak, és egysejtmagvas (~80%) és kétsejtmagvas vakuólumos mikrspórákat (~20%) tartalmaztak. A donor bimbókat 20 percig sterilizáltuk 2% nátrium hypochlorite oldatban 2-3 csepp 'Tween 20' oldat jelenlétében, majd steril vízzel háromszor öblítettük.

### Portokok előkezelése és a paprika mikrspórák izolálása

A steril bimbókból 20-25 portokot izoláltunk 55 mm átmérőjű üveg Petri csészékbe, amelyek 5 ml mennyiségű 0,3 M mannit oldatot és 200 mg ml<sup>-1</sup> cefotaxime antibiotikumot tartalmaztak. A paprika portokok mikrspórái az előtenyésztés során fejlődési állapotukra nézve szinkronizálódtak 32°C-on 7 napig, ami lényegesen előnyösebb volt nagyszámú, ideális fejlettségi állapotú mikrspórák izolálásához.

Paprika mikrspórák izolálásához a korábban publikált protokollokat használtuk (PAUK et al. 2003, LANTOS et al. 2005). Alapvető módosítás volt, hogy a sűrűség grádiens centrifugálás során, 21%-os maltóz oldat helyett, 30%-os maltóz oldatot alkalmaztunk.

### ***Izolált mikrspórák tenyésztése***

A mikrspórákat 35 mm átmérőjű műanyag Petri csészében tenyésztettük, amely 1,5 ml módosított W14 tápoldatot tartalmazott (OUYANG ET AL. 1989), a következő módosított komponensekkel: 9% maltóz és  $1000 \text{ mg l}^{-1}$  glutamin Ficoll nélkül (W14mi). Minden tenyészet körülbelül 45 000 mikrspórát tartalmazott ( $\sim 30\,000 \text{ mikrspóra ml}^{-1}$ ). Hét izolált steril búza ováriumot (CY-45 genotípus) tettünk minden Petri csészébe. A mikrspórákat  $28^{\circ}\text{C}$ -on sötét termosztátban tenyésztettük, majd fejlődésüket CK-2 Olympus invert mikroszkóppal tanulmányoztuk.

### ***Növényregenerálás***

Amikor a mikrspóra-eredetű embriók elérték a 3-4 mm-es nagyságot, 8-10 embrioidot helyeztünk R1 táptalajt tartalmazó Petri csészékbe (DUMAS DE VAULX ET AL. 1981). A növénykéket  $24^{\circ}\text{C}$ -on 8 órás megvilágítás és  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  fényintenzitás mellett regeneráltuk.

### ***Statisztikai analízis***

A statisztikai elemzések (egytényezős variancia analízis, és kétmintás t-próba) legalább háromismétléses kísérletek alapján készültek. Az elemzésekhez a Minitab 14 statisztikai programot (Minitab Inc., USA) használtuk.

## **EREDMÉNYEK**

Három fűszerpaprika fajta ('Szegedi 178', Jeromin, Jaranda) üvegházból begyűjtött donor bimbóit használtuk kísérleteinkben. A portokokban lévő mikrspórákat 1 hétig  $0,3 \text{ M}$  mannit oldatban  $32^{\circ}\text{C}$ -on éhezettük. Az előkezelés során szinkronizálódott mikrspórákat sűrűség grádiens centrifugálással izoláltuk. Kísérletünkben, egy bimbó elegendő volt 1 Petri csésze izolált mikrspóra tenyészet elkészítéséhez, amely körülbelül 45000 mikrspórát tartalmazott. A paprika mikrspóra tenyészetben búza ováriumokkal (CY-45) dajkatenyésztést alkalmaztunk, amely segítette a mikrspóra eredetű embrioidok fejlődését (1.a ábra).

Exogén hormonok hatását tanulmányoztuk három fűszerpaprika fajta izolált mikrspóra tenyészeteiben. Három különböző kezelést hasonlítottunk össze: (i) a W14mi0 tápoldat nem tartalmazott hormonokat, a W14mi tápoldat  $0,5 \text{ mg l}^{-1}$  2,4-D-vel és  $0,5 \text{ mg l}^{-1}$  kinetinnel volt kiegészítve, míg a W14miPAA tápoldat  $5 \text{ mg l}^{-1}$  PAA-t (fenil-ecetsav) tartalmazott.

A tenyészetekben lévő embrioidok számát a tenyésztés 6. hetén regisztráltuk. A három fajta átlaga alapján, a mikrspóra eredetű embrioidok száma a W14mi tápoldatban volt a legmagasabb majd a W14mi0 és a W14miPAA tápoldat követte (1. táblázat). A 'Jaranda' fajta statisztikai elemzése alapján, az embrioidok száma a W14mi tápoldatban volt a legmagasabb, a W14mi és a W14mi0 tápoldat embrioid mennyisége között nem volt szignifikáns a különbség. Jeromin fajtánál, az embrioidok mennyisége a W14mi0 és a W14mi tápoldatban volt a legmagasabb, de a különbség 95%-os biztonság mellett nem volt szignifikáns a két tápoldat között, azonban a W14miPAA tápoldat embrioid száma szignifikánsan rosszabb volt, mint a másik két tápoldat esetében. A 'Szegedi 178' fajta mikrspóra tenyészeteit tekintve a W14mi0 tápoldatban fejlődött a legtöbb embrioid. Több

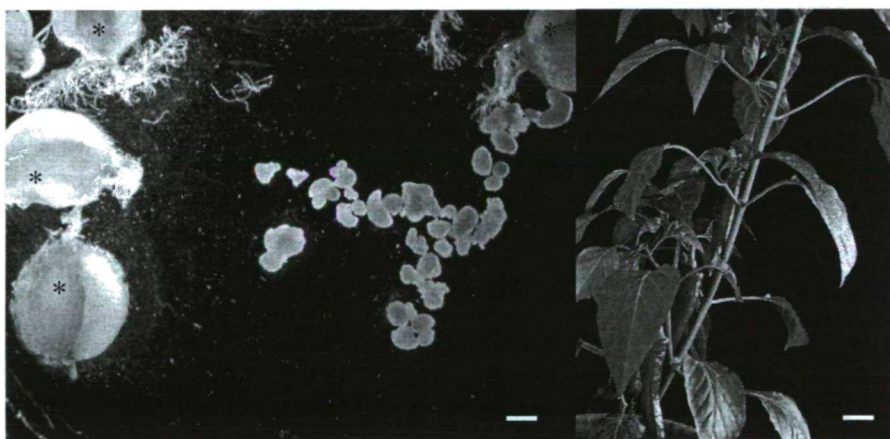
mint a W14mi és a W14miPAA tápoldatokban. A különbség a tápoldatok között statisztikailag nem volt szignifikáns. A három fajtán elvégzett kísérlet után - az embrioidok száma alapján – azt az eredményt kaptuk, hogy a W14mi és a W14mi0 tápoldat a legígéretesebb, szemben a W14miPAA tápoldattal (1. táblázat).

1. táblázat: Exogén hormonok hatása az embrioidok számára különböző fűszerpaprika fajták izolált mikrospóra tenyészeiben. Az egyes sorokban lévő azonos betűk a szignifikánsan nem különböző értékeket mutatják 95%-os biztonsággal mellett.

Genotípus	Mikrospóra eredetű embrioidok száma/ Petri csésze			
	W14mi0	W14mi	W14miPAA	SzD <sub>5%</sub>
Szegedi 178	6,75 a	3,75 a	2,5 a	4,35
Jeromin	12,40 a	11,80 a	2,0 b	8,095
Jaranda	14,25 a	34,50 a	-	ns*
Fajták átlaga	11,13	16,68	2,25	

\*ns: statisztikailag nem szignifikáns a különbség

A mikrospóra eredetű embrioidok növényregenerálása kritikus lépésnek bizonyult fűszerpaprikában. Néhány struktúra normális *in vitro* hajtásokat regenerált három héten belül, amelyekből fertilis növények regenerálódtak (1.b ábra). A hajtások többsége amorf volt rozettás levelekkel, vagy nem hozott hajtást a regeneráló tápközegen.



1. ábra. a, Paprika mikrospórákat búza ováriumokkal (\*) közösen tenyésztettük, a tenyésztés 4. hetén szabad szemmel látható embrioidok figyelhetők meg. b, A mikrospóra eredetű embrioidokból fertilis fűszerpaprika növényeket állítottunk elő. Méretvonal = a, 1 mm; b, 1 cm.

## KÖVETKEZTETÉSEK

A paprika izolált mikrospóra tenyésztés világviszonylatban is új területnek számít a szakirodalomban. Az első kísérletek után (SUPENA ET AL. 2006) 2008-ban jelent meg az első olyan publikáció, amely részletesen beszámolt a 'Milyang-jare' genotípus mikrospóra tenyésztéséről (KIM ET AL. 2008). Jelen munkánkban három fűszerpaprika fajta (Szegedi 178, Jeromin, Jaranda) esetében sikeresen indukáltuk a haploid embriogenezist paprika izolált mikrospóra tenyészetben.

Fűszerpaprika genotípusok mikrospóra tenyésztésére a W14 alaptápoldatot használtuk. Ez a tápoldat korábban jó eredményeket adott búza portoktenyésztésben (OUYANG ET AL. 1983)

és izolált mikrospóra tenyészetben (LANTOS ET AL. 2005). Az egyszikű fajokkal (búza, rizs) elért eredmények után a W14 tápoldatot használtuk kétszikűek mikrospóra tenyésztésére is. Paprika haploid indukciós kísérletekben különböző hormonokat alkalmaznak (MITYKÓ ET AL. 1995, GYULAI ET AL. 2000, KIM ET AL. 2004, BÁRÁNY ET AL. 2005, SUPENA ET AL. 2006). Portoktenyésztésre a legtöbb laboratórium által a 2,4-D és kinetin hormon kombinációja ajánlott az indukciós táptalajban, amíg izolált mikrospóra tenyészetben a hormonmentes tápoldatot alkalmazták (Kim et al. 2008). A mi kísérletünkben, ahol egy hormon (5 mg l<sup>-1</sup> fenil-ecetsav) egy hormonkombináció (0,5 mg l<sup>-1</sup> 2,4-D és 0,5 mg l<sup>-1</sup> kinetin) és a hormonmentes tápközeg hatását hasonlítottuk össze, a legjobb eredményeket a hormonmentes tápoldattal – hasonlóan a nemzetközi eredményekhez (KIM et al. 2008) - illetve a 2,4-D és kinetin hormonkombinációval érték el. A megfelelő növekedés szabályzók kiválasztásával nemcsak az embrioidok száma és minősége, hanem a növényregenerációs képesség is javítható.

A hazai és nemzetközi eredmények továbbfejlesztését követően az izolált mikrospóra tenyésztés alternatív lehetőséggé válhat a paprika DH vonalak előállítására a nemesítők és kutatók kezében. Eredményeink alapján, hogy ezt a célt elérjük, jelentős módszertani fejlesztésre van szükség. Minden valószínűség szerint új megközelítéseket, módszertani újításokat kell felfedezni ahhoz, hogy mikrospóra tenyésztéssel nagyszámú paprika haploidokat hozzunk létre.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A szerzők köszönetüket fejezik ki Olasz Máriának, Kun Zsuzsannának és Táborosiné Ábrahám Zsuzsannának lelkiismeretes munkájukért. Köszönet illeti Maria Isabel Garcia Pomart, hogy biztosította számunkra a spanyol fűszerpaprika genotípusokat. A munkát az NKTH és a KPI támogatta (a project száma: DA\_TECH\_05-FPFTT005).

## IRODALOMJEGYZÉK

- BÁRÁNY, I., GONZÁLEZ-MELENDI, P., FADÓN, B., MITYKÓ, J., RISUENO, M. C. (2005): Microspore-derived embryogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.): subcellular rearrangements through development. *Biology of Cell* 97 (9): 709-722.
- BUYUKALACA, S., COMLEKCIOGLU, N., ABAK, K., EKBIC, E., KILIC N. (2004): Effects of silver nitrate and donor plant growing conditions on production of pepper (*Capsicum annuum* L.) haploid embryos via anther culture. *European Journal of Horticulture Science* 69 (5): 206-209.
- DOLCET-SANJUAN, R., CLAVERIA, E., HUERTA A. (1997): Androgenesis in *Capsicum annuum* L. Effects of carbohydrate and carbon dioxide enrichment. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 122: 468-475.
- DUMAS DE VAULX, R., CHAMBONNET, D., POCHARD E. (1981): Culture *in vitro* d'anthères du piment (*Capsicum annuum* L.): amélioration des taux d'obtention de plantes chez différents génotypes par des traitements à + 35 C. *Agronomie* 1: 859-864.
- ERCAN, N., SENSOY, F. A., SENSOY S. (2006): Influence of growing season and donor plant age on anther culture response of some pepper cultivars (*Capsicum annuum* L.). *Scientia Horticulturae* 110 (1): 16-20.
- GÉMES JUHÁSZ, A., SÁGI, ZS., SALAMON, P., SOMOGYI, N., ZATYKÓ, L., VENCZEL G. (1998): Experiences and results of *in vitro* haploid methods application in pepper breeding programme. Xth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of *Capsicum* and Eggplant. Avignon, France, September 7-11. *Proceedings*: 201-203.
- GÉMES JUHÁSZ, A., VENCZEL, G., SÁGI, ZS., GAJDOS, L., KRISTÓF, Z., VÁGI, P., ZATYKÓ L. (2006): Production of doubled haploid breeding lines in case of paprika, eggplant, cucumber, zucchini and onion. *Acta Horticulture* 725: 845-854.

- GEORGE, L., NARAYANASWAMY S. (1973): Haploid *Capsicum* through experimental androgenesis. *Protoplasma* 78: 467-470.
- GYULAI, G., GÉMESNÉ J., A., SÁGI, Z., VENCZEL, G., PINTÉR, P., KRISTÓF, Z., TÖRJÉK, O., HESZKY, L., BOTTKA, S., KISS, J., ZATYKÓ L. (2000): Doubled haploid development and PCR-analysis of F-1 hybrid derived DH-R-2 paprika (*Capsicum annuum* L.) lines. *Journal of Plant Physiology* 156 (2): 168-174.
- HESZKY, L., KISS SIMON I. (1992): Dáma, the 1<sup>st</sup> Hungarian biotech plant variety. *Növénytermelés* 41 (6): 555-557
- KIM, M., KIM, J., YOON, M., CHOI, D. I., LEE K. M. (2004): Origin of multicellular pollen and pollen embryos in cultured anthers of pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 77: 63-72.
- KIM, M., JANG, I. C., KIM, J. A., PARK, E. J., YOON M., LEE Y. (2008): Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture, *Plant Cell Reports* 27 (3): 425-434.
- KRISTIANSEN, K., ANDERSEN S. B. (1993): Effect of donor plant-temperature, photoperiod, and age on anther culture response of *Capsicum annuum* L. *Euphytica* 67 (1-2): 105-109.
- KUO, J. S., WANG, Z. Z., CHIEN, N. F., KU, S. J., KUNG, M. L., HSU H. C. (1973) Investigations on the anther culture *in vitro* of *Nicotiana tabacum* L. and *Capsicum annuum* L. *Acta Botanica Sinica* 15:43-47
- LANTOS, C., JANCÓS, M., PAUK J. (2005): Microspore culture of small grain cereals. *Acta Physiologiae Plantarum* 27 (4B): 631-639.
- LI, S. N., HESZKY, L., SIMON, I. K., HORVÁTH Zs. (1986): Production and applicability of doubled-haploid somaclones in rice. *Oryza*, 23: 229-234.
- MITYKÓ, J., ANDRÁSFALVY, A., CSILLÉRY, G., FÁRY M. (1995): Anther-culture response in different genotypes and F1 hybrids of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Breeding* 114 (1): 78-80.
- MITYKÓ, J., GÉMES JUHÁSZ A. (2006): Improvement in the haploid technique routinely used for breeding sweet and spice peppers in Hungary. *Acta Agronomica Hungarica* Vol. 54. (2): 203-219.
- MITYKÓ, J., SZABÓ, L., BARNABÁS B. (1999): Colchicine induced ultrastructural changes in barley and pepper microspores *J. Slovak Acad.Sci.* 54: 24-25.
- OUYANG J. W., JIA S. E., ZHANG, C., CHEN, X., FEN G. (1989): A new synthetic medium (W14) for wheat anther culture. *Annual Report, Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing*, pp. 91-92.
- PAUK, J., KERTÉSZ, Z., BEKE, B., CSOSZ, M., MATUZ J. (1995): New winter-wheat variety- GK Délibáb developed via combining conventional breeding and *in vitro* androgenesis, *Cereal Research Communications* 23 (3) 251-256
- PAUK, J., MIHÁLY, R., MONOSTORI, T., PUOLIMATKA M. (2003): Protocol of triticales (x *Triticosecale Wittmack*) microspore culture, in: M. Maluszynski M, K.J. Kasha, B.P. Forster, I. Szarejko (Eds.), *Doubled Haploid Production in Crop Plants, a manual*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 129-134.
- SOMOGYI, N., MOOR, A., PÉK M. (2003): The preservation and production of *Capsicum* in Hungary, in: A. De Krishna (Ed.), *Medicinal and aromatic plants – Industrial profiles*, Volume *Capsicum* (Chilli), Taylor & Francis Books, London-New York, pp. 144-161.
- SUPENA, E. D. J., Suharsono, S., Jacobsen, E., Custers J. B. M. (2006): Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Reports* 25 (1): 1-10.
- WANG, Y. Y., SUN, C. S., WANG, C. C., CHEN N. F. (1973): The induction of pollen plantlets of *Triticale* and *Capsicum annum* from anther culture. *Scientia Sinica* 16: 147-151.